Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Die α-HBDH- und ICDH-Bestimmung im Serum und ihre korrelative Betrachtung mit anderen Enzymaktivitätsmessungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wilfried Grau
aus Augsburg

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543901_0100

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Die α-HBDH- und ICDH-Bestimmung im Serum und ihre korrelative Betrachtung mit anderen Enzymaktivitätsmessungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wilfried Grau
aus Augsburg

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Eggstein
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. H.E. Bock

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v.Spangenberg KG • Tübingen

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
1. Modifikationen der α-HBDH- und ICDH-Bestimmung	2
2. Korrelative Betrachtung bekannter Enzymbestimmungen mit α-HBDH- und ICDH-Bestimmung	2
3. Modifikation der α-HBDH- und ICDH-Bestimmung	3
4. Bestimmung von Normalwerten	3
5. Möglichkeit einer Verbesserung der diagnostischen Aussage durch zusätzliche Bestimmung der α-HBDH- und ICDH-Aktivität bei Herzinfarkt	3
6. Zusätzliche Bestimmung der α-HBDH- und ICDH-Aktivität bei Hepatiden und malignen Haemoblastosen	4
7. LDH-Isoenzymverteilung bei Hepatitis	4
8. Statistische Auswertung der Ergebnisse und Aufstellung von Regressionsfunktionen und Korrelationskoeffizienten	4
Methodik	5
1. Prinzip der LDH-Bestimmung	5
2. Prinzip der GOT-, GPT- und CPK-Bestimmung	5
3. Prinzip der GLDH-, LAP- und ALD-Bestimmung	6
4. Bestimmung der α-Hydroxybutyratdehydrogenase (Mikromethode)	7
5. Bestimmung der Isocitrat-Dehydrogenase	8
6. Vergleichbarkeit der einzelnen Enzymbestimmungen	8
7. Vergleichbarkeit der Verdünnungsfaktoren	9
8. Bestimmung der LDH-Isoenzyme	9

Seite

Ergebnisse 11

I. Beurteilung der von uns modifizierten Enzymbestimmungen 11

1. Modifikation der Boehringer Methode zur α-HBDH-Bestimmung 11

a) Modifikation der Pufferlösung 11

b) Änderung der Substratmenge 11

c) Änderung der Serummenge 11

d) Änderung der NaDH-Konzentration 11

e) Ergebnisse bei der Modifikation der Boehringer Methode 12

2. Bestimmung der Isocitrat-Dehydrogenase 13

a) Modifikation der Pufferlösung und Serummenge 13

b) Haltbarkeit der Lösungen 14

c) Ergebnisse bei Verdünnung der Seren mit hohen Enzymaktivitäten 14

3. Berechnung der Enzymaktivitäten 14

4. Doppelbestimmungen 14

II. Normalwerte 14

III. Pathologische Werte 16

1. Vergleich der LDH-, CPK- und GPT-Bestimmungen 16

2. Hepatitis 19

3. Maligne Haemoblastosen 22

4. Prüfquotient LDH/α-HBDH 23

5. Elektrophoretische Trennung der LDH-Isoenzyme 26

6. LDH-Isoenzymverteilung bei Herzinfarkt 28

7. LDH-Isoenzymverteilung bei Hepatitis 28

8. Vergleich der Regressionskoeffizienten und ihrer Konfidenzintervalle bei Herzinfarkt und Hepatitiden 30

Seite

9. Typischer Verlauf einer hochgradigen Leberzellschädigung bei Essigsäure-vergiftung 31

Diskussion 34

Zusammenfassung 37

Literatur

E i n l e i t u n g

Zu differentialdiagnostischen Untersuchungen werden in neuerer Zeit vermehrt Enzymreaktionen herangezogen 1). Die Enzymaktivitäten z.B. im Blutserum lassen sich mit Hilfe von optischen Tests durch Messung von Extinktionsänderungen in der Zeiteinheit verfolgen 2).

Die Enzymkonzentrationen im menschlichen Blutserum sind normalerweise recht gering, so daß sich gegenüber den mit Enzymen reich bepackten Zellen ein beachtliches Konzentrationsgefälle ergibt. Kommt es zu Zellschädigungen, so können Enzyme in das Blutserum austreten. In gewissen Grenzen kann dabei der Enzymaustritt die Größe der Zellschädigung widerspiegeln 3).

Für die Enzymbestimmung als Mittel für die medizinische Diagnostik ist es wichtig, möglichst empfindliche und organspezifische Enzymgruppen zu erfassen. Unter diesem Gesichtspunkt unterscheidet man organspezifische Enzyme, wozu u.a. auch die meisten Leberenzyme zählen, und relativ organspezifische Enzymmuster aus Hauptkettenenzymen und schließlich die Koenzyme.

Isoenzyme 5) sind Enzymgruppen, die die gleiche Reaktion katalysieren, sich untereinander jedoch in verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften unterscheiden, so daß sie z.B. im elektrischen Feld verschieden schnell wandern. Die einzelnen Isoenzyme können nun, falls ihre Auftrennung gelingt, wiederum bestimmten Organen zugeordnet werden, in denen sie hauptsächlich vorkommen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist die korrelative Betrachtung verschiedener Enzymbestimmungen. Da die Aussagekraft von Enzymuntersuchungen, vor allem was die Organspezifität betrifft, durch gleichzeitige Untersuchungen mehrerer Enzymaktivitäten verbessert wird, verglichen wir eingeführte und neuentwickelte Enzymaktivitätsbestimmungen

miteinander. Je mehr einfach durchführbare Enzymkontrollen zur Verfügung stehen, umso besser wird die Möglichkeit, aus der Summe der verschiedenen Enzymreaktionen Rückschlüsse auf das erkrankte Organ zu ziehen; denn das Enzymmuster des erkrankten Organs spiegelt sich im Enzymmuster und in der Isoenzymverteilung des Serums wider. Dabei kann es infolge verschieden schnellen Abbaus der einzelnen Enzyme zu gewissen Überlagerungen und Verzerrungen im Organenzymmuster kommen, was bei der Beurteilung berücksichtigt werden muß 37).

1. Modifikationen der α-HBDH- und ICDH-Bestimmung

Im Verlauf unserer Arbeiten erschien uns notwendig, eine im Handel erhältliche Enzymtestkombination Biochemica Test Combination, Fa. Boehringer, Mannheim zur α-HBDH-Bestimmung zu überprüfen und zu modifizieren. Zur Sicherung der Ergebnisse arbeiteten wir mit Chemikalien verschiedener Herkunft. Unsere Modifikationen bezogen sich auf die verwendete Pufferlösung, Änderung von Substrat- und Serummenge und Veränderung der NaDH -Konzentration. In ähnlicher Weise verfuhren wir bei der ICDH-Bestimmung, wobei wir gleichzeitig die Haltbarkeit der Reagenzlösungen untersuchten.

2. Korrelative Betrachtung bekannter Enzymbestimmungen mit α-HBDH- und ICDH-Bestimmung

Wir verglichen α-HBDH- und ICDH-Bestimmungen mit folgenden im klinischen Laboratorium routinemäßig ausgeführten Enzymuntersuchungen:

Lactat-Dehydrogenase (LDH)
Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)
Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)

Bei Herzinfarkt nahmen wir die Creatin- Phosphokinase-(CPK)-Bestimmung hinzu. Solange bei dieser Erkrankung die CPK-Konzentration im Blutserum noch erhöht ist, kann man annehmen, daß es sich tatsächlich um frische Fälle von Herzinfarkt handelt 30). Diesen bereits routinemäßig ausgeführten Enzymreaktionen sollten die α-Hydroxybutyrat-Dehydro-

genase-(α-HBDH)-Bestimmung 6) 7) 8) 10) und der Isocitrat-Dehydrogenase-(ICDH)-Test 9) zugeordnet werden mit der Frage, ob diese erweiterte Enzymdiagnostik durch eine höhere Organspezifität bei relativ leichter Durchführbarkeit Vorteile bringt.

Unsere Enzymuntersuchungen bezogen sich auf Patienten mit Herzinfarkt, Hepatitis und Haemoblastosen. Bei einem Fall einer schweren Essigsäurevergiftung konnte die Änderung des Enzymbildes zeitlich verfolgt werden.

3. Modifikationen der α-HDBH- und ICDH-Bestimmung

Um einen exakten Vergleich der α-HDBH-Bestimmung mit den routinemäßig ausgeführten Enzymreaktionen zu gewährleisten, wurde die von ROSALKI und WILKINSON 6) beschriebene α-HBDH-Methode so modifiziert, daß der optische Test als Mikromethode im Photometer Eppendorf mit Küvettenwechselautomatik durchgeführt werden konnte. In ähnlicher Weise versuchten wir die ICDH-Bestimmung abzuändern.

4. Bestimmung von Normalwerten

Bevor wir uns der Untersuchung von Krankenkollektiven zuwandten, ermittelten wir Normalwerte gesunder Personen (N = 41).

5. Möglichkeit einer Verbesserung der diagnostischen Aussage durch zusätzliche Bestimmung der α-HBDH- und ICDH-Aktivität bei Herzinfarkt

Da bei den oben genannten in der Klinik routinemäßig ausgeführten Bestimmungen der Hauptkettenenzyme, nämlich LDH-, GOT- und GPT-Test, Aktivitätserhöhungen als Folge von Leber- und anderen Organschädigungen relativ häufig sind, bringen sie für die Myocardinfarktdiagnostik eine Unsicherheit bezüglich ihrer Aussagekraft 35). Es war zu prüfen, inwieweit die zusätzliche Bestimmung der ICDH- und α-HBDH-Aktivität eine Verbesserung der diagnostischen Aussage ermöglicht 11) 12) 13) 14).

6. Zusätzliche Bestimmung der α-HBDH- und ICDH-Aktivität bei Hepatitiden und malignen Haemoblastosen

Bezüglich der Hepatitiden war zu prüfen, ob durch Anwendung der α-HBDH- und ICDH-Bestimmung eine Verbesserung oder Vereinfachung der bisherigen enzymdiagnostischen Möglichkeiten zu erzielen war. Bei akuten Leukosen ist der Anstieg der Enzymaktivitäten von LDH, GOT und GPT sehr uneinheitlich. Er schwankt zwischen Werten nahe der Norm und extrem erhöhten Werten. Durch zusätzliche α-HBDH- und ICDH-Bestimmung sollten diese enzymdiagnostischen Ergebnisse erweitert werden.

7. LDH-Isoenzymverteilung bei Hepatitis

Als wichtiges Hilfsmittel zur Früherkennung der Hepatitis und zur Sicherung der Diagnose bei anikterischer Hepatitis dient die Bestimmung der Transaminasen GOT und GPT. Zur weiteren Klärung der Diagnose kann das LDH-Isoenzymmuster elektrophoretisch aufgetrennt werden.

8. Statistische Auswertung der Ergebnisse und Aufstellung von Regressionsfunktionen und Korrelationskoeffizienten

Mit der Regressions- und Korrelationsberechnung wird der Zusammenhang zweier Variabler ermittelt. Der Zusammenhang ist umso straffer, je mehr der Korrelationskoeffizient r sich +1 oder -1 nähert. Die Regressionsgerade $y = bx + a$ dient zur Charakterisierung der Berechnung beider Variabler, wobei a die Lagekonstante, b die Steigung (Regressionskoeffizient) bedeutet. Es sollten die Regressions- und Korrelationskoeffizienten für Normalpersonen, Patienten mit Herzinfarkt, Hepatitiden und malignen Haemoblastosen ermittelt werden

M e t h o d i k

1. Prinzip der LDH-Bestimmung

Die Laktetdehydrogenase (LDH) katalysiert die Hydrierung von Pyruvat zu Laktat unter NADH-Oxydation. Der NADH-Verbrauch in der Zeiteinheit wird gemessen.

Wir wandten die Mikromethode nach KUBOWITZ und OTT 15) an (Biochemica Test Combination der Fa. Boehringer, Mannheim). Der optische Test erfolgte mittels der Küvettenwechselautomatik im Photometer (Eppendorf) bei 334 nm.

2. Prinzip der GOT-, GPT- und CPK-Bestimmung

Die Bestimmung von GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase) und CPK (Creatin-Phosphokinase) erfolgte ebenfalls mit einer volumenmodifizierten Boehringer Test Combination, die photometrische Auswertung nahmen wir wie bei der LDH-Bestimmung vor.

a) Prinzip der GOT-Bestimmung

Die GOT-Aktivität katalysiert die Gleichgewichtsreaktion

$$\text{Glutamat} + \text{Oxalacetat} \rightleftharpoons \text{Aspartat} + \alpha\text{-Ketoglutarat}$$

Die Zunahme der Oxalacetatkonzentration ist noch nicht Meßgröße, sondern sie wird mit einer weiteren durch Malatdehydrogenase katalysierten Indikatorreaktion gekoppelt:

$$\text{Oxalacetat} + \text{NADH} + H^+ \rightleftharpoons \text{Malat} + NAD^+$$

Die Abnahme der NADH in der Zeiteinheit wird bei 334 nm gemessen 25).

b) Prinzip der GPT-Bestimmung

Die GPT-Aktivität katalysiert die Gleichgewichtsreaktion

$$\text{Glutamat} + \text{Pyruvat} \rightleftharpoons \text{Alanin} + \alpha\text{-Ketoglutarat}$$

Die Zunahme der Pyruvatkonzentration kann noch nicht direkt gemessen werden, sondern wird, wie bei der GOT-Bestimmung, mit einer Indikatorreaktion gekoppelt. Diese verläuft wie folgt:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Lactat} + \text{NAD}^+$$

Die Abnahme der NADH in der Zeiteinheit wird bei 334 nm gemessen 2).

c) Prinzip der CPK-Bestimmung

Die CKP-Aktivität katalysiert die Gleichgewichtsreaktion

$$\text{Creatin} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Creatinphosphat} + \text{ADP}$$

Die ADP-Zunahme wird nicht direkt gemessen, sondern ADP wird in der durch Pyruvatkinase katalysierten Hilfsreaktion ADP + PEP $\rightleftharpoons$ ATP + Pyruvat und in durch LDH katalysierte Indikatorreaktion bestimmt:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Lactat} + \text{NAD}^+$$

NADH ist Meßgröße und wird auf Grund seiner Absorption bei 334 nm bestimmt 26).

3. Prinzip der GLDH-, LAP- und ALD-Bestimmung

Nur in einem einzigen Fall, einer Essigsäurevergiftung, wurden zusätzliche Enzymtests, GLDH (Glutamat-Dehydrogenase), LAP (Leucin-Amino-Peptidase) und ALD (Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase) ausgeführt, alle mit den entsprechenden Boehringer Test Combinationen.

a) Prinzip der GLDH-Bestimmung

GLDH katalysiert die Reaktion NADH zu NAD^+.
Nach E. SCHMIDT 27) wird die Geschwindigkeit der NADH-Abnahme in der Zeiteinheit bei 334 nm gemessen.

b) Prinzip der LAP-Bestimmung

L - Leucin - nitranilid wird durch die LAP in Leucin und p-Nitranilin gespalten. Die nach einer bestimmten Zeit freigesetzte p-Nitranilin-Menge ist proportional der LAP-Aktivität und kann auf Grund ihrer gelben Farbe photometrisch bestimmt werden 28).

c) Prinzip der ALD-Bestimmung

Die Aldolase gehört zu den Fermenten der Glykolyse. Durch die Aldolase wird Fructose-1,6-Diphosphat in Dioxyaceton-

phosphat und Glycerinaldehydphosphat gespalten. NADH (reduziertes Nicotinamidadeninnucleotid) wirkt als Wasserstoffüberträger. Der Verbrauch in der Zeiteinheit wird bei 334 nm gemessen 29).

4. Bestimmung der α-Hydroxybutyratdehydrogenase (Mikromethode)

Prinzip: Die α-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase katalysiert die Hydrierung von α-Ketobutyrat zu α-Hydroxybutyrat unter NADH-Oxydation. Der NADH-Verbrauch in der Zeiteinheit wird gemessen.

Reagentien:

Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	4 873
Kaliumhydrogenphosphat	"	5 099
Natriumazid	"	6 688
α-Ketobutyrat	Fluka A	55 106
NADH Boehringer		15 142

Arbeitsweise:
Aus 15 ml Phosphatpuffer (I) und 0,5 ml NADH-Lösung (II) wird vor Beginn der Untersuchung eine Mischung bereitet. Für jeden Test werden nunmehr 1,5 ml dieser Mischung mit 0,1 ml frischem, haemolysefreiem Serum versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Min. bei 25° C wird die Reaktion mit 0,05 ml α-Ketobutyratlösung (III) gestartet.

I. Phosphatpuffer:
   a) m/20 KH_2PO_4 = 6,8 g KH_2PO_4 (Merck 4873) in 1000 ml dest. Wasser. 500 mg Natriumazid (Merck 6688)
   b) m/20 K_2HPO_4 = 11,4 g K_2HPO_4 . 3 H_2O (Merck 5099) in 1000 ml dest. Wasser 500 mg Natriumazid
   c) 1000 ml I b) mit ca. 180 ml Ia) auf pH 7,5 einstellen

II. NADH 0,008 m Dinatriumsalz (Boehringer 15 142) = 56,7 mg werden in 10 ml 1% $NaHCO_3$ gelöst.

III. In 100 ml des Phosphatpuffers I c) werden 1020 mg α-Ketobuttersäure gelöst.

Die photometrische Auswertung wurde mit einem registrierenden Photometer (Eppendorf) bei 334 nm in MT 4 Küvetten bei 1 cm Schichtdicke vorgenommen. Der Extinktionskoeffizient beträgt bei 334 nm 3,3 cm^{-2}, der Verdünnungsfaktor 16,5.

5. Bestimmung der Isocitrat-Dehydrogenase 9)
Mikromethode modifiziert nach der von Fa. Boehringer empfohlenen Arbeitsvorschrift

Prinzip: Das Enzym Isocitratdehydrogenase katalysiert die Umwandlung von Isocitrat in α-Ketobutyrat unter Bildung von CO_2 und Reduktion von NADP (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) = TPN (Triphosphopyridinnucleotid) zu NADPH + H^+. NADPH + H^+ ist Meßgröße. Die Zunahme in der Zeiteinheit wird registriert.

Reagentien:
Triäthanolamin
Natriumchlorid
DL-Isocitrat
Mangansulfat

Arbeitsweise: 1,25 ml Puffer-Substratgemisch (Lösung I) werden mit 0,3 ml frischem, haemolysefreiem Serum versetzt und 5 Min. bei 25° C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wird mit 0,05 ml NADP-Lösung (Lösung II) gestartet.

I. Puffer-Substratgemisch
a) 0,1 m Triäthanolamin
b) 0,052 m Natriumchlorid
c) 0,0046 m DL-Isocitrat

II. NADP-Lösung
0,0091 m NADP
0,12 m Mangansulfat

6. Vergleichbarkeit der einzelnen Enzymbestimmungen

Um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Enzymbestimmungen untereinander zu gewährleisten, wurden alle Enzymaktivitäten jeweils aus derselben Serumprobe bestimmt.

7. Berechnung der Verdünnungsfaktoren

Zur Faktorbestimmung bei Enzymaktivitätsmessungen sind zu berücksichtigen:

a) Der Verdünnungsfaktor des Serums. Dieser rührt von der Zugabe der Reagentien zum Serum her.
b) Die Reaktionszeit. Das ist das Zeitintervall zwischen zwei Ablesungen.
c) Mikromolarer NADH- bzw. NADPH-Extinktionskoeffizient bei 334 nm.

Der Endfaktor berechnet sich aus:

Verdünnungsfaktor x Zeitfaktor x reziproker mikromolarer Extinktionskoeffizient

Für die Küvettenwechselautomatik ist bei der Faktorstellung folgendes zu berücksichtigen: Der Extinktionsabfall wird gegen die Zeit registriert. Der Maßstab für Ordinate und Abszisse ist jedoch unterschiedlich; eine Minute entspricht 1 cm Vorschub, während die Extinktion 1,0 20 cm entspricht. Die Zeit wird somit 20 mal "kürzer" als die Extinktion registriert. Demzufolge muß die Extinktionsänderung durch 20 dividiert werden.

8. Bestimmung der LDH-Isoenzyme

Der LDH-Enzymkomplex wurde auf Agar elektrophoretisch aufgetrennt und nach Anfärben der Teilfraktionen photometrisch ausgewertet. Die Auftrennung dieses Komplexes wurde wie folgt durchgeführt: Auf Objektträgern, die einseitig mit einer 1%-igen Agarlösung beschichtet werden, läßt sich der LDH-Enzym-Komplex mittels Elektrophorese bei 220 V und 50 mA auftrennen. Die Laufzeit beträgt 4 Stunden, als Puffer dient 0,1 m Barbital-Na-Puffer von pH 8,4 und einer Jonenstärke von 0,24. Als Untersuchungssubstanz dient das unveränderte Serum, von dem etwa 0,2 ml auf eine zuvor in den Agar geschnittene Kerbe aufgetragen werden. Nach der elektrophoretischen Trennung werden die Präparate entwickelt und die einzelnen Isoenzyme als gefärbte Banden sichtbar gemacht, anschließend fixiert und getrocknet 17).

Prinzip: Die Reaktion beruht auf einer mehrstufigen Wasserstoffübertragung auf das Färbematerial, das die Enzymaktivität als stark gefärbtes unlösliches Präzipitat markiert 34). Die grobquantitative Auswertung erfolgt im Integrator nach Wieland 18). Alle im folgenden beschriebenen Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen ausgeführt. Zur Auswertung werden die einzelnen Banden fortlaufend von 1 bis 5 numeriert. Dabei ist Bande 1 die der Anode zunächst liegende.

An dieser Stelle möchten wir uns bei Herrn Dr.med. Ch. Fröhlich, Medizinische Klinik der Universität Tübingen, für die Einführung in die Methodik bestens bedanken.

Ergebnisse

I. Beurteilung der von uns modifizierten Enzymbestimmungen

1. Modifikation der Boehringer Methode zur α-HBDH-Bestimmung

a) Modifikation der Pufferlösung

Im Gegensatz zu den Angaben der Fa. Boehringer verwendeten wir die oben beschriebene 0,05 m Phosphatpufferlösung mit pH 7,5 wie sie auch für den LDH-Test verwendet wird. Von der Firma Boehringer wird eine 0,05 m Phosphatpufferlösung mit pH 7,4 angegeben.

Eine Abweichung bei den Ergebnissen konnten wir nicht feststellen. Der Vorteil unserer Modifikation liegt darin, daß für LDH- und α-HBDH-Bestimmung nur immer eine Pufferlösung vorbereitet werden muß.

b) Änderung der Substratmenge

Wurde jedoch die Substratkonzentration schrittweise erhöht, so erreichte die Enzymaktivität ein Maximum bei Verwendung von 0,1 m α-Ketobuttersäure. Die genannte Konzentration entspricht 0,329 mg α-Ketobuttersäure pro ml beim eigenen Ansatz, während der Original Boehringer Ansatz eine Konzentration von 0,309 mg α-Ketobuttersäure pro ml verwendet. Mit dieser Erhöhung erreicht man das Substratoptimum. Eine weitere Erhöhung des Konzentrats ergab keine höheren Enzymaktivitäten.

c) Änderung der Serummenge

Durch Verdoppelung der Serummenge von 0,05 (Boehringer) auf 0,1 ml (eigener Ansatz) wird die Reaktionszeit so weit verlängert, wie dies bei Verwendung eines Küvetten-Wechselautomaten notwendig ist.

d) Änderung der NADH-Konzentration

Neben der Serummenge wirkte auch die für die Test Combination angegebene 0,004 m NADH-Konzentration limitierend.

Deshalb wurde die NADH-Konzentration erhöht:

Boehringer Ansatz: 0,000120 m NADH-Konzentration
Eigener Ansatz: 0,000233 m NADH-Konzentration

e) Ergebnisse bei der Modifikation der Boehringer Methode

Ein selbsthergestellter Ansatz von Reagenzlösungen zeigte gegenüber der von Fa. Boehringer gelieferten Test Combination TC-ID keinerlei Unterschiede. Dagegen änderten sich die Ergebnisse, wenn wir die Substratmengen variierten. Auf Grund unserer Vorversuche legten wir eine Versuchsreihe mit 0,1 ml Serum an, bei der der α-HBDH-Gehalt des Serums von 50 Patienten mit verschiedenen Krankheitsbildern ausgewertet wurde (Tabelle 1). Beim Vergleich ergab sich, daß die Werte bei Bestimmung nach der Original Boehringer Methode bei 84,6 % $\pm$ 9,8 % (M$\pm$s) der mit eigenem Ansatz ermittelten Werte liegen.

Tabelle 1

	Krankheit	α-HBDH Boehringer Test Comb. mU/ml	α-HBDH eigener Ansatz mU/ml
1	Herzinfarkt	219	267
2	Terpentin Vergiftung	41	48
3	Solides Ca	518	584
4	Lungenblutung	56	86
5	Mamma Ca	103	126
6	Lebercirrhose	125	139
7	Herzinfarkt	541	585
8	Mamma Ca	41	74
9	Morbus Brill S.	185	238
10	Herzinfarkt	75	126
11	Uraemie	219	307
12	Colitis ulcerosa	153	216
13	Herzinfarkt	46	58
14	Herzinfarkt	85	105
15	Herzinfarkt	178	285
16	akut. Leukämie	158	181
17	Lungen Tuberculose	69	81
18	Myelose	185	187
19	fieberh. Infekt	206	216
20	Herzinfarkt	252	285
21	Herzinsuffiziens	171	175
22	Diab. mellitus	123	139
23	Herzinfarkt	246	274

	Krankheit	α-HBDH Boehringer Test Comb. mU/ml	α-HBDH eigener Ansatz mU/ml
24	Diab. mellitus	134	145
25	Hepatitis	128	149
26	z.B. Lunge	114	145
27	Herzinfarkt	171	194
28	Herzinfarkt	91	107
29	Morbus Hodgkin (Pleurapunktat)	41	43
30	Anaemie	59	72
31	Myocardinfarkt	237	267
32	Zust.n.Hepatitis	51	71
33	Hepatitis	79	97
34	Sprue	87	91
35	Herzinfarkt	103	105
36	chron. Hepatitis	60	64
37	Herzinfarkt	41	50
38	Lungen-Tuberculose	69	78
39	Pleuropneumonie	140	149
40	Morbus Hodgkin	186	215
41	Verdacht Herzinfarkt	231	265
42	chron. Hepatitis	59	72
43	Verdacht Herzinfarkt	166	172
44	Hepatitis	69	87
45	Anaemie	44	50
46	Herzinfarkt	214	250
47	Plasmocytom	64	75
48	Morbus Hodgkin	95	112
49	Herzinfarkt	231	265
50	Myelose	159	172

In der obigen Tabelle wurden bei unausgewählten Patienten mit verschiedenen Krankheitsbildern die α-HBDH-Aktivitäten mit Boehringer Test Combination und mit eigenem Ansatz verglichen. Es wurden 0,1 ml Serum eingesetzt.

Die Überprüfung der mit beiden Methoden gewonnenen Ergebnisse zeigte sichere Differenzen (t-Test: t = 7,949).

2. Bestimmung der Isocitrat-Dehydrogenase

a) Modifikation der Pufferlösung und Serummenge

Auf Grund unserer Vorversuche genügte für die Untersuchung 1,25 ml Puffer-Substratgemisch (Lösung I), während eine Erhöhung der Serummenge keine wesentlichen Vorteile bot.

b) Haltbarkeit der Lösungen

Die gebrauchsfertig angesetzte Pufferlösung ist bei Zimmertemperatur ca. 20 Tage haltbar, etwa doppelt so lange bei + 4° C. Die Haltbarkeit der NADP-Lösung ist geringer und beträgt bei + 4° C ca. 20 Tage.

c) Ergebnisse der Verdünnung der Seren mit hohen Enzymaktivitäten

Bei Extinktionsdifferenzen pro Minute über 0,050 (bei 334 nm) verdünnten wir das Serum mit Pufferlösung, zunächst im Verhältnis 1 : 2, dann 1 : 5 und evtl. 1 : 10, da sonst die Reaktion zu schnell abläuft und die Proportionalität zur Zeit nicht mehr gewahrt ist.

3. Berechnung der Enzymaktivitäten

Eine Internationale Einheit (International Unit, I.U.) bezeichnet die Enzymmenge, die bei 25° C den Umsatz von 1 Mol Substrat in 1 Minute bewirkt. Dieses Maß wurde von RACKER und Mitarbeitern 40) vorgeschlagen und von der Enzyme Commission der International Union of Biochemistry (IUB) und der Clinical Chemistry Commission der International Union of Pure and Applies Chemistry (IUPAC) übernommen 39).

4. Doppelbestimmungen

Zur Sicherung unserer Ergebnisse nahmen wir je 18 Doppelbestimmungen vor. Für die α-HBDH-Enzymbestimmungen erhielten wir eine durchschnittliche Abweichung von 0,06 mU/ml ($M \pm s$ = 73,6 $\pm$ 0,06 mU/ml), bei der ICDH-Bestimmung eine Abweichung von 0,05 mU/ml ($M \pm s$ = 0,96 $\pm$ 0,05 mU/ml). Der Variationskoeffizient für Messungen in der Serie liegt für α-HBDH bei 8,15% für ICDH bei 5,21%

II. Normalwerte

Für das Auffinden von Normalwerten der LDH-, α-HBDH- und ICDH-Aktivität stand uns ein Kollektiv von 41 Studenten

und Blutspendern zur Verfügung. Eine Auswahl wurde insofern getroffen, als für die Ermittlung von Normalwerten nur Serum von Personen Verwendung fand, deren GPT-Aktivität im Serum 6 mU/ml nicht überschritt und deren LDH-Aktivität nicht über 195 mU/ml lag. Die Auswertung der Normalwerte ergab bei

LDH-Bestimmung M ± s = 127,6 ± 28,6 mU/ml
α-HBDH-Bestimmung M ± s = 72,8 ± 20,5 mU/ml
ICDH-Bestimmung M ± s = 0,8 ± 0,3 mU/ml

Dabei lagen die Einzelwerte bei LDH zwischen 64 und 195 mU/ml, bei α-HBDH zwischen 35 und 129 mU/ml und bei ICDH zwischen 0,0 und 2 mU/ml.

Eine Zusammenfassung der Normalwerte für LDH, α-HBDH und ICDH zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2

Probanden	LDH mU/ml	α-HBDH mU/ml	ICDH mU/ml
1	156	90	0
2	156	84	1
3	150	87	1
4	162	97	2
5	138	60	0,1
6	168	105	1
7	121	72	1,5
8	150	125	2
9	132	75	1
10	126	75	1
11	121	78	1
12	144	90	1
13	115	81	1,5
14	150	97	0
15	115	69	0
16	195	129	1,5
17	89	39	0,5
18	181	84	1
19	144	60	2
20	181	66	1,5
21	105	47	1
22	99	49	0
23	79	35	0,5
24	110	47	1
25	102	42	1
26	126	69	1
27	144	75	1
28	106	71	1

Probanden	LDH mU/ml	∝-HBDH mU/ml	ICDH mU/ml
29	94	62	0,5
30	96	53	0,5
31	108	71	0
32	64	44	0,5
33	122	86	0,5
34	102	62	0,5
35	117	71	0,5
36	128	74	0,5
37	122	74	0
38	102	71	0
39	128	81	0,5
40	150	66	0,5
41	134	74	1

Tabelle 2 zeigt eine Zusammenstellung der LDH-, ∝-HBDH- und ICDH-Aktivitäten bei Normalpersonen.

Der Korrelationskoeffizient r für LDH zu ∝-HBDH wurde mit 0,748 ± 0,1305 bestimmt.

Als Quotient LDH/ ∝-HBDH errechneten wir

$$M \pm s = 1,83 \pm 0,40$$

Für die Regressionsfunktion für LDH- und ∝-HBDH-Enzymbestimmung wurde eine Regressionsgerade aufgestellt, siehe Abb. 1. Der Regressionskoeffizient beträgt

$$b = 0,537 \pm 0,094$$

III. Pathologische Werte

1. Vergleich der LDH-, CPK- und GPT-Bestimmungen mit ∝-HBDH und JCDH bei Herzinfarkt

Bei 40 ausgewählten Patienten mit frischem Herzinfarkt fanden wir die in Tabelle 3 zusammengestellten Werte. Als frisch betrachteten wir dabei Fälle, bei denen das Infarktereignis nicht länger als eine Woche zurücklag. Die Aktivitäten der zum selben Zeitpunkt bestimmten klassischen Enzymgrößen LDH, GPT und CPK wurden mit der ∝-HBDH- und ICDH-Aktivität verglichen.

Fehlbeurteilungen sind bei der Diagnose des Herzinfarktes wegen des raschen Anstieges und Abfalles der CPK-Aktivität möglich. Diese Gefahr wird noch dadurch erhöht, daß eine

ABB. 1: REGRESSIONSFUNKTION FÜR LDH- UND α-HBDH-ENZYMBESTIMMUNG BEI NORMAL-PERSONEN

Tabelle 3

Patienten	LDH mU/ml	α-HBDH mU/ml	CPK mU/ml	GOT mU/ml	GPT mU/ml	ICDH mU/ml
1	1430	707	8,5	35	25	1
2	670	231	0,55	15	9	1
3	128	41	0,96	9	5	1
4	181	105	0,96	32	20	4
5	265	216	0,96	10	8	3
6	175	91	0,13	32	23	4
7	134	105	0,4	7	4	3
8	318	274	6,0	22	6	1
9	344	285	0,4	46	14	5
10	209	194	0,55	8	3	1
11	112	80	1,0	9	6	3
12	102	71	0,13	9	5	1
13	216	145	0,55	7	5	3
14	230	161	0,4	11	7	3
15	1620	1370	3,8	46	28	4
16	122	97	1,0	15	18	4
17	94	66	2,3	12	6	1
18	202	155	2,0	8	4	3
19	376	265	1,0	15	6	3
20	242	125	0,4	8	4	2
21	242	116	1,0	9	4	4
22	156	72	1,0	11	9	3
23	121	72	0,3	9	4	9
24	162	112	1,0	9	6	2
25	332	254	1,0	21	10	5
26	126	75	1,8	13	5	1
27	298	185	0,8	9	5	2
28	217	160	1,7	28	19	3
29	188	63	0,3	18	13	2
30	320	224	2,1	33	9	1
31	99	75	0,8	18	15	1
32	126	84	1,0	17	11	1
33	110	55	0,5	18	10	1
34	126	62	1,2	14	8	2
35	121	87	1,0	22	6	3
36	126	84	9,4	8	2	5
37	384	254	0,7	46	14	6
38	370	268	4,1	21	15	4
39	288	207	1,5	11	7	2
40	126	84	1,2	12	9	3

Tabelle 3 zeigt einen Vergleich der routinemäßig ausgeführten Bestimmungen (LDH, CPK, GPT) mit den neueren Enzymbestimmungen α-HBDH und ICDH bei ausgewählten Patienten mit frischem Herzinfarkt.

gefundene geringgradige Erhöhung wenig Aussagekraft hat, weil CPK auch ohne Muskelgewebsnekrose, z.B. allein nach

körperlicher Belastung und bei Muskeldystrophien vermehrt im Blut gefunden werden kann 31) 32). Inwieweit kann die ICDH- und α-HBDH-Bestimmung eine Verbesserung der Aussagekraft bringen? Wir fanden, daß die ICDH nach dem Infarktereignis nur mäßig erhöht war, nämlich auf das 3,5-fache der Norm, wobei zur Veränderung der LHD-Aktivität kein Zusammenhang erkennbar war. Im Gegensatz dazu gehen beim Herzinfarkt erhöhte LDH-Werte mit erhöhten α-HBDH-Werten einher. Dieser parallele Verlauf der α-HBDH- und LDH-Werte verbessert die Aussagekraft besonders dann, wenn die CPK-Aktivität im Normalbereich gefunden wird. Bei Auswertung der LDH-Bestimmungen fanden wir als Mittelwert $M \pm s = 280,20 \pm 311,6$ mU/ml, bei α-HBDH fanden wir $M \pm s = 184,4 \pm 224,5$ mU/ml und bei ICDH $M \pm s = 2,8 \pm 2,9$ mU/ml. Die Einzelwerte liegen für LDH zwischen 94 und 1620 mU/ml, für α-HBDH zwischen 41 und 1370 mU/ml und für ICDH zwischen 1 und 9 mU/ml. Der Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0,943 \pm 0,093$. Der Quotient LDH/α-HBDH bringt auch eine Verbesserung der diagnostischen Aussage besonders für die Fälle, bei denen LDH und α-HBDH nur geringgradig erhöht sind. Der Anstieg der α-HBDH-Aktivität setzt meist erst einige Tage nach dem Infarktereignis ein, ähnlich wie dies für den Anstieg der LDH-Aktivität gilt.

Während bei Herzinfarkt mit $M \pm s = 1,61 \pm 0,55$ der LDH/α-HBDH-Quotient unter der Norm mit $M \pm s = 1,83 \pm 0,40$ liegt, steigt er - siehe unten - bei Hepatitiden über die Norm auf $M \pm s = 1,93 \pm 0,41$. Zwischen beiden Quotienten bestehen signifikante Differenzen, wie unten gezeigt werden soll. Durch die Regressionsfunktion für LDH- und α-HBDH-Enzymbestimmung wird die enge Beziehung zwischen diesen beiden Enzymaktivitäten (Regressionskoeffizient $b = 0,679 \pm 0,0673$) deutlich gemacht, siehe Abb. 2.

2. Hepatitis

Im Serum von Patienten mit Hepatitis epidemica verlaufen die Aktivitäten von GOT, GPT und LDH weitgehend parallel 33). Fälle mit besonders hohem Anstieg der LDH-Werte zeigen auch einen hohen Anstieg der GOT- und GPT-Werte (siehe

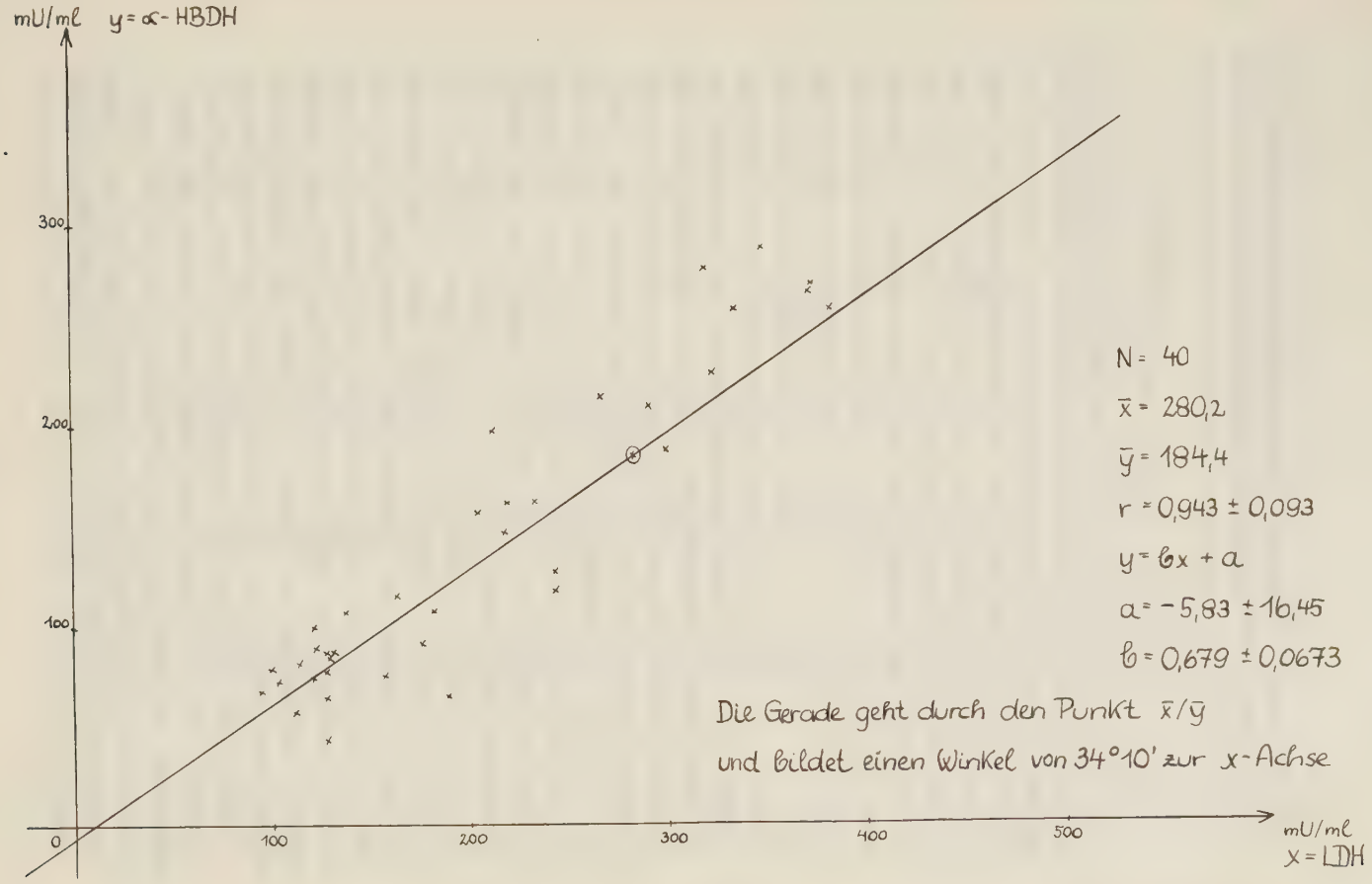


Abb. 2: REGRESSIONSFUNKTION FÜR LDH- UND α-HBDH-ENZYMBESTIMMUNG BEI FRISCHEM HERZINFARKT

Tabelle 4). Das statistische Maß für diese Beziehung bilden die Korrelationskoeffizienten. Bei einigen Hepatitiden wurden Enzymaktivitäten gefunden, die nur wenig über dem Normalbereich lagen oder bei denen nur einzelne Enzymaktivitäten erhöht waren (z.B. ICDH).

Tabelle 4

Patienten	LDH mU/ml	ICDH mU/ml	α-HBDH mU/ml	GOT mU/ml	GPT mU/ml
1	330	34	149	130	135
2	169	12	100	110	70
3	399	42	196	330	410
4	121	6	75	26	21
5	188	29	100	105	175
6	640	47	329	480	360
7	216	14	149	96	88
8	175	10	58	62	36
9	276	61	155	460	560
10	242	45	121	340	480
11	278	14	172	300	920
12	115	2	66	7	11
13	144	6	97	43	70
14	399	72	181	315	390
15	175	7	126	80	140
16	344	70	154	600	630
17	175	2	84	24	40
18	99	1	42	8	10
19	162	7	149	36	31
20	202	7	120	62	32
21	156	4	81	12	16
22	188	9	97	33	60
23	138	5	69	17	18
24	233	16	116	220	285
25	268	44	105	460	600
26	181	8	108	74	50
27	188	12	108	72	38
28	162	11	98	165	190
29	350	44	154	400	780
30	217	7	105	46	125
31	217	5	149	42	180
32	138	2	47	74	70
33	144	3	68	50	50

Tabelle 4, Hepatitis. Es werden den Werten der α-HBDH- und ICDH-Aktivitäten die Werte für LDH, GOT und GPT gegenübergestellt.

Der Quotient GOT/GPT liegt bei der Hepatitis in der Regel unter 1. Bei 33 ausgewählten Fällen fanden wir einen Quotienten von 0,748 38). Die oben genannten Enzym-

bestimmungen wurden weiterhin mit α-HBDH- und ICDH-Aktivität verglichen. Die gegenüber der Norm stark erhöhte ICDH-Aktivität folgte in der Regel der Erhöhung der Transaminase-Werte, besonders zur GPT ergibt sich eine gute Korrelation. Der Korrelationskoeffizient r beträgt 0,857 $\pm$ 0,094.

Die ICDH-Aktivität bei der Hepatitis ist gegenüber der Norm im Mittel etwa 25-fach erhöht, während die Aktivität bei Herzinfarkt nur um das 3,5-fache über der Norm liegt. Während die LDH-Aktivität bei Hepatitis ähnlich wie beim Herzinfarkt ansteigt, zeigt die α-HBDH relativ niedrigere Werte. Wir fanden bei Auswertung der LDH-Bestimmung als Mittelwert M $\pm$ s = 225,12 $\pm$ 243,86, für α-HBDH M $\pm$ s = 119,03 $\pm$ 56,31 und für ICDH M $\pm$ s = 19,93 $\pm$ 21,08. Die Einzelwerte liegen für LDH zwischen 99 und 640 mU/ml, für α-HBDH zwischen 42 und 329 mU/ml und für ICDH zwischen 1 und 72 mU/ml. Der Korrelationskoeffizient beträgt für die Beziehung LDH zu α-HBDH r = 0,918 $\pm$ 0,071.

Der Quotient LDH/α-HBDH wurde mit M $\pm$ s = 1,93 $\pm$ 0,41 ermittelt, gegenüber M $\pm$ s = 1,83 $\pm$ 0,40 bei Normalen und M $\pm$ s = 1,61 $\pm$ 0,55 bei Herzinfarkt. Die Regressionsfunktion LDH- und α-HBDH-Enzymaktivitäten zeigt die Abb. 3. Als Regressionskoeffizienten fanden wir b = 0,4579 $\pm$ 0,201.

3. Maligne Haemoblastosen

Bei 19 ausgewählten Fällen von akuten Myelosen und Schüben von chronischen Myelosen fanden wir zumeist die LDH-Enzymaktivität stark erhöht. Im Extremfall lag sie bei 3560 mU/ml, was dem 28-fachen der Norm entspricht. Nachdem die GOT- und GPT-Aktivität 16) allenfalls in Einzelfällen etwas über der Norm liegt, war interessant zu prüfen, inwieweit für ICDH und α-HBDH eine Erhöhung nachzuweisen war. Dabei zeigte sich, daß beide Enzyme erhöht waren. Für ICDH fanden wir eine Erhöhung auf das 9-fache der Norm, für α-HBDH auf das 6,5-fache. Auffallend ist, daß die ICDH-Werte unterschiedlich stark erhöht sind (siehe Tabelle 5), während die α-HBDH mit der Erhöhung der LDH parallel läuft. Als Mittelwert fanden wir für LDH M $\pm$ s = 813,0 $\pm$ 818,91, für α-HBDH

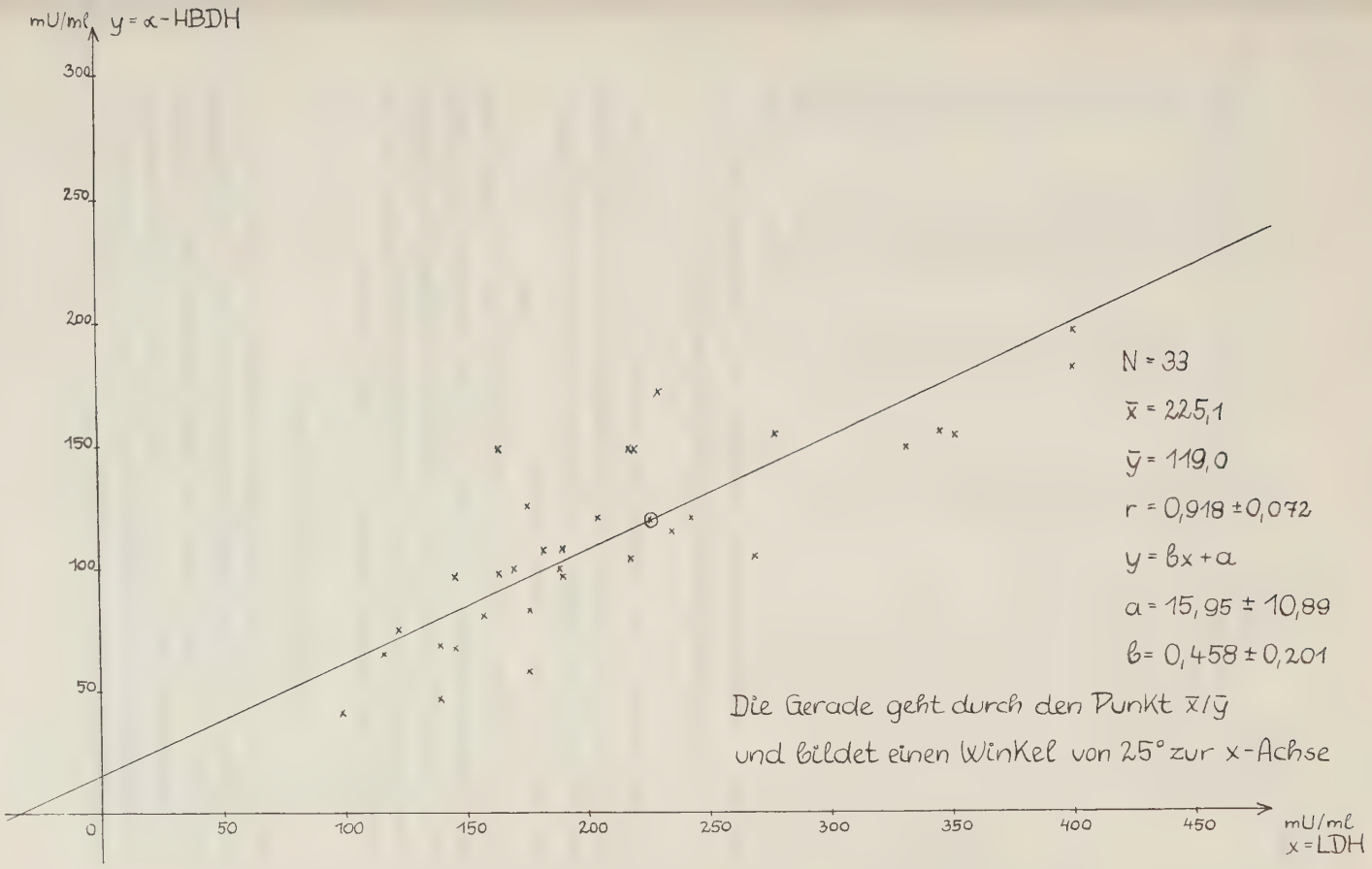


Abb.3: REGRESSIONSFUNKTION FÜR LDH- UND α-HBDH-ENZYMBESTIMMUNG BEI HEPATITIS

Tabelle 5

Patienten	ICDH mU/ml	GOT mU/ml	GPT mU/ml	LDH mU/ml	α-HBDH mU/ml
1	11	27	15	700	510
2	12	27	18	552	356
3	7	11	11	750	341
4	8	25	32	510	341
5	17	44	22	371	223
6	5	9	5	400	307
7	6	15	16	498	384
8	3	13	12	371	238
9	21	-	-	1010	510
10	3	38	8	3560	1397
11	4	8	4	810	640
12	1	56	3	2250	1515
13	3	6	3	399	172
14	13	7	8	370	192
15	1	5	2	121	78
16	2	5	6	110	60
17	14	86	34	500	355
18	-	-	-	1085	860
19	10	19	7	1080	448

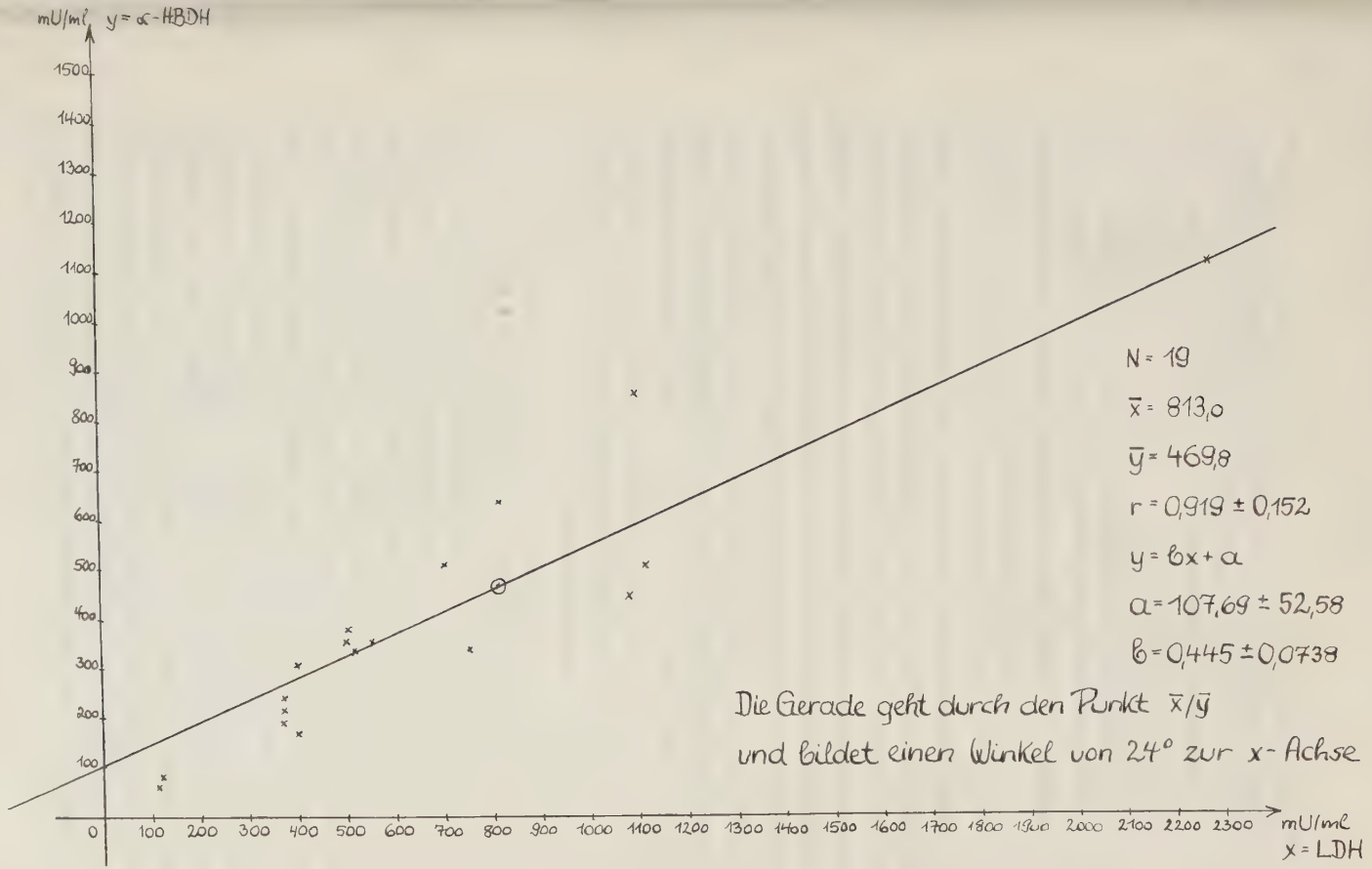
Tabelle 5, Haemoblastosen. α-HBDH- und ICDH-Aktivität werden den Routinebestimmungen gegenübergestellt.

M ± s = 469,84 ± 396,66 und für ICDH M ± s = 7,17 ± 6,89. Die extremen Positionen der Einzelwerte finden wir für LDH bei 110 und 3560 mU/ml, für α-HBDH bei 60 und 1515 mU/ml und für ICDH bei 1 und 21 mU/ml.

Für die Beziehung LDH zu α-HBDH errechneten wir den Korrelationskoeffizienten r = 0,919 ± 0,152. Der Quotient LDH/α-HBDH beträgt M ± s = 1,71 ± 0,41. Abb. 4 zeigt die Regressionsfunktion für LDH- und α-HBDH-Enzymbestimmung, der Regressionskoeffizient beträgt b = 0,445 ± 0,07.

4. Prüfquotient LDH/α-HBDH

Anhand der untersuchten Krankheitsgruppen stellten wir für die Beziehung LDH/α-HBDH Prüfquotienten auf, siehe Tabelle 6. Besonders divergent fanden wir den Prüfquotienten Hepatitis zu Herzinfarkt mit 2,89. Den Prüfquotienten Normalpersonen zu Herzinfarkt errechneten wir mit 2,11. Alle anderen Prüfquotienten lagen deutlich niedriger.



A66.4 : REGRESSIONSFUNKTION FÜR LDH- UND α-HBDH-ENZYMBESTIMMUNG BEI "LEUKOSEN"

Tabelle 6

	Prüfgruppen	Prüf-Quotient
1.	Normal-Herzinfarkt	2,1117
2.	Normal-"Leukosen"	1,1021
3.	Normal-Hepatitis	-1,0369
4.	"Leukosen"-Hepatitis	-1,8889
5.	"Leukosen"-Herzinfarkt	-0,7841
6.	Hepatitis-Herzinfarkt	2,8924

Tabelle 6: Prüfquotient LDH/α-HBDH bei normalen und pathologischen Werten

Die oben beschriebenen Ergebnisse bei der Ermittlung der Prüfquotienten (t-Test bzw. Welch-Test) können indessen nur als Anhalt dienen, da die Quotienten aus biologischen Meßwerten in der Regel nicht normalverteilt sind. Deshalb entschieden wir uns für den Mittelwertsvergleich nach Mann-Whitney (Wilcoxon Test) für unabhängige Stichproben 36).

Dabei ergab sich für die Beziehung Normalpersonen (n=41) zu Herzinfarkt (n=40) p = 0,001 und für Hepatitis (n=33) zu Herzinfarkt (n=40) p = 0,0003. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt damit im ersten Fall bei 1 % ,im zweiten bei 0,3 % , d.h., daß sich in beiden Fällen die Mittelwerte signifikant unterscheiden.

5. Elektrophoretische Trennung der LDH-Isoenzyme

Die LDH-Werte, die wir durch chemische Umsetzung mit den entsprechenden Enzymtest-Reagentien erhielten, erfassen alle den LDH-Isoenzym-Komplex als ganzen. Diese Gesamt-LDH-Aktivität des Serums beruht auf der Anwesenheit verschiedener Enzymproteine gleicher Wirkungs- und Substratspezifität, die jedoch verschiedenen Ursprungs sein können. Die im Serum gefundenen LDH-Aktivitäten aus Herz, Leber usw. lassen sich elektrophoretisch in verschiedene enzymatisch aktive Fraktionen, die Isoenzyme, trennen. Für die praktische Medizin wird die organspezifische Heterogenität der LDH-Enzymaktivität dadurch bedeutsam, daß sie sich auch nach dem Übertritt vom Organ in das Serum nachweisen läßt. So wurde bei der elektrophoretischen Trennung der LDH-

Isoenzyme im Hepatitisserum die größte Aktivität in der am langsamsten zur Anode wandernden Bande (Bande V) gefunden. Bei Serum von Herzinfarktpatienten findet sich die größte Aktivität in den schnell zur Anode wandernden Banden, Bande I und II.

Herz und Leber nehmen hinsichtlich der Eigenschaften ihrer Isoenzyme extreme Positionen ein, während bei anderen Geweben wegen der großen Ähnlichkeit der Isoenzyme eine genaue Aussage über den geschädigten Zellverband erschwert ist. Die Veränderung in der Verteilung der Isoenzyme im Serum nach einem Herzinfarkt sind auch dann noch nachweisbar, wenn sich die Gesamtaktivität der LDH im Serum bereits wieder normalisiert hat.

Serum ausgewählter Blutspender, mit einer GPT-Aktivität nicht über 6 mU/ml, wurde zur Auffindung von Normalwerten herangezogen. Es wurde der spektrophotometrisch ermittelte Wert der LDH-Gesamtaktivität in Beziehung gesetzt zu den elektrophoretisch aufgetrennten LDH-Isoenzymen, deren Wertigkeit in relativen Prozenten angegeben ist (Tabelle 7).

Tabelle 7

Probanden	Elektrophorese Banden					GPT
	I	II	III	IV	V	mU/ml
1	41	47	6	3	3	3
2	34	45	10	6	5	3
3	39	41	9	6	5	1
4	39	42	7	7	5	1
5	41	43	8	5	3	4
6	39	41	8	6	6	5
7	35	41	13	6	5	5
8	46	46	5	2	1	3
9	35	43	11	6	5	3
10	34	38	12	8	8	6
11	36	33	11	11	9	4
12	36	38	11	8	7	6
13	42	41	7	5	5	4
14	38	36	9	9	8	4
15	33	35	13	10	9	2
16	34	41	9	8	8	3
17	37	45	10	4	4	6

Probanden	Elektrophorese Banden					GPT
	I	II	III	IV	V	mU/ml
18	40	45	9	4	2	3
19	35	41	13	6	5	5
20	41	43	8	5	3	5

Tabelle 7 zeigt Normalwerte von Blutspendern nach elektrophoretischer Auftrennung der LDH-Isoenzyme. Die Werte bei der elektrophoretischen Auftrennung sind in relativen Prozenten angegeben.

6. LDH-Isoenzymverteilung bei Herzinfarkt

Für 12 ausgewählte Fälle von frischem Herzinfarkt wurden aus dem gleichen Serum LDH-Gesamtaktivität, LDH-Isoenzyme, α-HBDH und CPK bestimmt. Die α-HBDH- und LDH-Gesamtaktivität zeigte sich unterschiedlich stark erhöht. Entsprechend der geringen Masse des beim Herzinfarkt geschädigten Gewebebezirkes kann der Anstieg der Enzymaktivitäten im Serum relativ gering sein. Auch bei geringem Anstieg der spektrophotometrisch bestimmbaren Enzymaktivitäten ergibt sich durch Elektrophorese ein für die Erkrankung typisches LDH-Isoenzymbild, als Beispiel Tabelle 8. Vergleicht man die Mittelwerte, die wir von Normalpersonen erhielten, mit den Mittelwerten von Patienten mit frischem Herzinfarkt, so ergeben sich signifikante Unterschiede in den Banden I und II, siehe Tabelle 10. Nähern sich im Verlauf des Heilungsprozesses die Enzymaktivitäten im Serum wieder der Norm, so bleiben trotzdem noch in den Banden I und II der LDH-Isoenzyme Unterschiede zu den Normalwerten bestehen, die das vorausgegangene Infarktereignis widerspiegeln (Tabelle 9 und 10).

7. LDH-Isoenzymverteilung bei Hepatitis

Bei elektrophoretischer Auftrennung des LDH-Isoenzymmusters fanden wir, daß die als leberspezifisch betrachtete Bande V in ihrer Intensität immer stark erhöht ist, auch dann, wenn die Erhöhung der Transaminase-Aktivitäten noch nicht eindeutig auf eine Hepatitis schließen läßt (Tabelle 11).

Tabelle 8

	Elektrophorese Banden					Gesamt-LDH	α-HBDH	CPK
	I	II	III	IV	V	mU/ml	mU/ml	mU/ml
1	49	29	9	6	7	134	97	0,3
2	54	36	5	2	3	1430	707	8,5
3	53	41	5	1	0	156	72	0,4
4	45	33	9	6	7	376	265	0,2
5	47	45	3	3	2	242	125	0,4
6	36	33	12	10	9	242	116	0,4
7	55	42	3	0	0	332	254	1,0
8	48	44	7	1	0	298	185	0,8
9	46	44	7	2	1	126	75	1,8
10	39	31	13	9	8	105	64	0,3
11	39	33	11	9	8	320	224	2,1
12	49	43	7	1	0	122	97	0,4

Tabelle 8: LDH-Isoenzymmuster bei 12 ausgewählten Fällen von frischem Herzinfarkt. Die Werte bei der elektrophoretischen Auftrennung sind in relativen Prozenten angegeben.

Tabelle 9

	Elektrophorese Banden 1-5					Gesamt-LDH	α-HBDH	CPK
						mU/ml	mU/ml	mU/ml
1	29	43	12	9	7	162	79	-
2	36	44	13	4	3	117	53	0,1
3	32	37	19	11	1	209	195	0,2
4	26	47	21	2	4	404	307	0,1
5	33	47	11	5	4	99	55	-
6	35	50	5	2	8	156	72	0,1
7	39	50	9	1	1	121	72	0,2
8	37	38	11	5	9	162	112	0,1
9	40	56	4	0	0	121	57	0,1
10	33	31	15	12	9	94	68	0,1
11	35	33	14	9	7	99	75	0,3
12	32	34	13	12	9	126	84	0,2

Tabelle 9: LDH-Isoenzymmuster bei 12 ausgewählten Fällen von Herzinfarkt im Abheilungsstadium. Die Werte bei der elektrophoretischen Auftrennung sind in relativen Prozenten angegeben.

Tabelle 10

Mittelwert	Elektrophorese Banden I	II	III	IV	V
Normal	38	41	9	6	5
Herzinfarkt frisch	47	38	8	4	4
Herzinfarkt abheilend	34	43	12	6	5
Hepatitis	26	40	12	4	18

Tabelle 10: Mittelwerte der LDH-Isoenzyme bei Normalpersonen und Krankenkollektiven. Die Werte sind in relativen Prozenten angegeben.

Tabelle 11

Patienten	Elektrophorese Banden I	II	III	IV	V	Gesamt-LDH mU/ml	α-HBDH mU/ml	GOT mU/ml	GPT mU/ml
1	20	56	16	2	12	181	108	150	170
2	34	35	7	1	23	276	155	460	560
3	19	38	18	5	20	258	98	325	470
4	20	30	7	1	42	344	154	600	630
5	27	43	14	5	11	175	84	24	40
6	25	41	8	4	22	640	329	480	360
7	22	52	12	3	11	202	120	32	62
8	30	28	18	9	15	144	97	43	70
9	33	35	14	5	13	162	98	165	190
10	30	39	13	6	12	115	63	100	180

Tabelle 11: LDH-Isoenzymmuster bei ausgewählten Fällen von Hepatitis. Die Werte bei der elektrophoretischen Auftrennung sind in relativen Prozenten angegeben.

8. Vergleich der Regressionskoeffizienten und ihrer Konfidenzintervalle bei Herzinfarkt und Hepatitiden

Für die LDH-Fraktion I und α-HBDH stellten wir für Herzinfarkt und Hepatitiden die Regressionskoeffizienten b und die Korrelationskoeffizienten r auf. Wir fanden für:

Herzinfarkt	$b_1 = 11,107$
	$r_1 = 0,3814$
Hepatitiden	$b_2 = -1,4683$
	$r_2 = 0,1094$

Die gefundenen Korrelationskoeffizienten lassen für Herzinfarkt und Hepatitiden rechnerisch auf keine nachweisbare Abhängigkeit von HBDH zu LDH I schließen.

Beim Vergleich der Regressionskoeffizienten für Herzinfarkt und Hepatitiden stellten wir die Hypothese auf: "Die Regressionskoeffizienten unterscheiden sich nur zufällig." Für diese Hypothese fanden wir einen t-Wert von -6,461. Dieser Wert entspricht p = 0,001. p ist die Irrtumswahrscheinlichkeit, wenn man die Hypothese verwirft. Das bedeutet, daß mit großer Wahrscheinlichkeit der Regressionskoeffizient b_1 (Herzinfarkt) vom Regressionskoeffizienten b_2 (Hepatitiden) verschieden ist.

Zur Überprüfung der obengenannten Ergebnisse führten wir eine Berechnung der Konfidenzintervalle für die Regressionskoeffizienten durch. Wir fanden für b_1 (Herzinfarkt ein Intervall von -4,32 bis 26,53 und für b_2 (Hepatitiden) von -10,23 bis 7,30. Da sich die Intervalle in gewissem Maße überschneiden, sind sie mathematisch nicht signifikant voneinander unterschieden. Das Ergebnis der Konfidenzintervall-Berechnung muß bei der Beurteilung des Ergebnisses beim Vergleich der Regressionskoeffizienten berücksichtigt werden.

Für seine freundliche Unterstützung danken wir Herrn Dr. Gulbinat vom Institut für Biometrie der Universität Tübingen.

9. Typischer Verlauf einer hochgradigen Leberzellschädigung bei Essigsäurevergiftung

Während das charakteristische Enzymbild der Hepatitis wegen der verschieden schnellen Inaktivierung der GOT und GPT mit dem Enzymbild der Leber selbst nicht übereinstimmt, erscheint im Serum eines akut toxisch Lebergeschädigten das

Leberenzymbild als fast genauer Abklatsch 19) Das kommt daher, daß nur bei der Vergiftung schnell eine größere Anzahl von Zellen hochgradig geschädigt wird, so daß das gesamte Enzymspektrum nicht nur aus dem Plasma, sondern auch aus den Mitochondrien der Leberzellen in das Serum austreten kann. Der starke Anstieg der Enzymaktivitäten zusammen mit relativ hohen GLDH-Werten läßt bei der toxischen Leberschädigung direkte Rückschlüsse auf den Grad der Schädigung zu. Im vorliegenden Fall wurden die sich ändernden Enzymaktivitäten in ihrem zeitlichen Ablauf verfolgt, siehe Tabelle 12.

Tabelle 12

Zeit	Gesamt-LDH mU/ml	α-HBDH mU/ml	GOT mU/ml	GPT mU/ml	ICDH mU/ml	Ald. mU/ml	LAP mU/ml	GLDH mU/ml
9^{00}	1560	737	560	-	81	19,5	1,7	11,8
16^{10}	2160	1020	530	210	129	18,0	2,1	24,0
17^{30}	1500	712	430	190	99	13,5	1,9	31,0
18^{20}	1400	638	320	170	96	11,5	1,7	43,0
Mittelwert	1655	777	460	190	101	15,6	1,85	27,5

Aus Tabelle 12 sind die im zeitlichen Ablauf sich ändernden Enzym-Aktivitäten bei einer Essigsäurevergiftung ersichtlich.

Bei der beschriebenen akuten toxischen Hepatose lag die LDH-Gesamtaktivität ca. 7-mal höher als bei Hepatitis und ca. 13-mal über Normal, die α-HBDH-Aktivität ca. 4-mal über Hepatitis und ca. 11-mal über Normal. Dementsprechend lag der Quotient α-HBDH/LDH mit 0,47 deutlich niedriger als bei Hepatitis mit 0,53. Auffallend hoch, wie sonst nur von der dekompensierten Cirrhose bekannt, lag der De Ritis Quotient GOT/GPT mit 2,5 21) 22). Die Werte der ICDH-Aktivität sind sehr stark erhöht und liegen ca. 125-mal höher als der Normalwert ($M \pm 2s = 0,8 \pm 0,4$ mU/ml). Gegenüber der Hepatitis sind die Werte des vorliegenden Vergiftungsfalles fünffach erhöht. Dabei wurden die Werte von Normalpersonen und Hepatitisfällen mit den Durchschnittswerten der aus Tabelle 12 ersichtlichen Einzelbestimmungen verglichen.

Der Durchschnittswert der Aldolaseaktivität (Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase) lag etwa 6-fach über der Norm, die bei 2,5 mU/ml anzunehmen ist 23), während die LAP (Leucin-Amino-Peptidase) keine signifikante Erhöhung zeigte.

Im Gegensatz zu allen untersuchten Enzymaktivitäten, die im Verlauf der Beobachtung in ihrer Konzentration abnahmen, stand die GLDH (Glutamat-Dehydrogenase). Dieses in den Mitochondrien lokalisierte Enzym nahm fortlaufend in seiner Serumkonzentration zu, was darauf schließen läßt, daß im Verlauf des Untersuchungszeitraumes fortschreitend bis zum Exitus letalis eine intensive Zellschädigung abgelaufen sein muß. Beim Vergleich zwischen dem Mittel der GLDH-Bestimmungen mit dem Normalwert (0,9 mU/ml) fanden wir eine 31-fache Erhöhung. Das verschieden starke Ansteigen der Enzymaktivitäten gegenüber den Normalwerten veranschaulicht Tabelle 13.

Tabelle 13

	Gesamt-LDH mU/ml	α-HBDH mU/ml	GOT mU/ml	GPT mU/ml	ICDH mU/ml	Ald. mU/ml	LAP mU/ml	GLDH mU/ml
Mittelwert	1655	777	460	190	101	15,6	1,85	27,5
Normalwert	127	73	10,6	7,3	0,8	2,5	1,5	0,9
Steigerungs-rate	13	11	43	26	125	6	1	31

Die unterschiedliche Steigerungsrate der Enzymaktivitäten bei einer Essigsäurevergiftung ist in Tabelle 13 zusammengefaßt.

Von dem um 16^{1o} entnommenen Serum wurden auch die LDH-Isoenzyme bestimmt, siehe Tabelle 14. Bei Beurteilung der erhaltenen Werte fällt auf, daß das Verhältnis der LDH-Isoenzyme praktisch der Normalverteilung entspricht, obwohl die spektrophotometrisch ermittelte Gesamt-LDH-Aktivität ca. 19-fach erhöht ist.

Tabelle 14

Elektrophorese Banden					Gesamt-LDH
I	II	III	IV	V	mU/ml
38	43	8	3	3	2160

Tabelle 14: Elektrophoretische Auftrennung der LDH-Isoenzyme bei einer Essigsäurevergiftung. Die Werte bei der elektrophoretischen Auftrennung sind in relativen Prozenten angegeben.

Diskussion

Die allgemein angewendete CPK-Bestimmung beim Herzinfarkt kann wegen des schnellen Ansteigens und Abfallens des Enzyms zu einer falsch negativen Beurteilung Anlaß geben. Im Falle eines niedrigen CPK-Wertes kann einem isoliert erhöhten LDH-Wert keine wesentliche Aussagekraft beigemessen werden, wird doch LDH auch z.B. bei Hepatitis, Tumoren u.a. erhöht gefunden. Eine entscheidende Verbesserung für die klinisch-chemische Differentialdiagnose liegt in der engen Korrelation LDH/α-HBDH bei Herzinfarkt. Wir ermittelten den Quotienten LDH/α-HBDH bei Herzinfarkt mit 1,60, bei Hepatitis dagegen mit 1,93. Setzt man im Mann-Whitney-Test diese Quotienten zueinander in Beziehung, so findet man, daß sich die Mittelwerte signifikant unterscheiden.

Eine weitere Sicherung der Diagnose besteht in der Bestimmung der LDH-Isoenzymverteilung durch elektrophoretische Auftrennung. Der Vorteil der α-HBDH-Bestimmung gegenüber der LDH-Isoenzymbestimmung zur zusätzlichen Sicherung der differentialdiagnostischen Abgrenzung zwischen Herzinfarkt und Hepatitis liegt nach unserer Auffassung auf Seiten der α-HBDH-Bestimmung. Diese ist schneller und mit weniger Arbeitsaufwand belastet. In besonderen Fällen wird man jedoch auf die Bestimmung der LDH-Isoenzymverteilung auch bei Herzinfarkt nicht verzichten wollen.

Die LDH-Isoenzymbestimmung wird sich bei "Leukosen" kaum durch zusätzliche α-HBDH-Bestimmung ersetzen lassen. Hier liegen nämlich die gefundenen Einzelwerte der spektrophotemetrisch bestimmten Enzymaktivitäten in so extremen Positionen, daß eine Beurteilung, wenn man vom klinischen Bild absieht, sehr erschwert ist.

Ob die α-HBDH-Aktivität einem selbständigen Enzym zuzuschreiben wäre oder ob es sich dabei um eine Fraktion der LDH-Isoenzyme handelt, konnte nicht eindeutig entschieden werden. Der Regressionskoeffizient b = 0,68 bei Herzinfarkt zeigt, daß hier die LDH-Aktivität mit einer entsprechenden Aktivitätssteigerung der α-HBDH einhergeht. Im Gegensatz

zum Herzinfarkt zeigten die Seren bei Hepatitiden einen Regressionskoeffizienten b = 0,40. Für "Leukosen" lag der Wert bei b = 0,44. Das unterschiedliche Ansteigen der LDH- und α-HBDH-Enzymaktivität bei Herzinfarkt bzw. bei Hepatitiden und Leukosen läßt vermuten, daß die α-HBDH-Enzymaktivität wohl nicht mit einem LDH-Isoenzym identisch sein dürfte.

Um diese Vermutung zu festigen, wurden die Regressionskoeffizienten für α-HBDH und LDH I bei Herzinfarkt und Hepatitiden rechnerisch verglichen. Wenn nämlich die α-HBDH bei Herzinfarkt mit der LDH-Fraktion I identisch sein soll, so muß das auch für Hepatitiden gelten. Die Berechnung ergab tatsächlich, daß die Regressionskoeffizienten sich nicht nur zufällig unterscheiden. Wir fanden einen t-Wert von -6,461, das entspricht $p = 0{,}001$. p ist die Irrtumswahrscheinlichkeit, wenn man die Hypothese "Die Regressionskoeffizienten unterscheiden sich nur zufällig" verwirft. Für den vorliegenden Fall bedeutet das , daß nur 1 ‰ Wahrscheinlichkeit besteht, daß die α-HBDH mit der Teilfraktion I der LDH identisch ist. Bei Beurteilung dieses Ergebnisses durch eine Bestimmung des Konfidenzintervalls für die beiden Regressionskoeffizienten muß allerdings die relativ große Streubreite der einzelnen Regressionen berücksichtigt werden.

Nach unserem Dafürhalten wäre die Frage in der Weise zu klären, daß für α-HBDH eine spezifische Färbemethode gefunden wird, die im gleichen pH-Bereich wirksam ist, wie die Färbemethode für die LDH-Isoenzyme bei Elektrophorese.

Zur Sicherung einer Diagnose ist die ICDH-Bestimmung neben den klassischen Enzymbestimmungen entbehrlich. Hinsichtlich der methodischen Durchführbarkeit kommt der ICDH-Bestimmung die gleiche Wertigkeit wie der LDH-Bestimmung zu. Im Hinblick auf die große Empfindlichkeit von Enzymbestimmungen könnte zur Ausschaltung von Hepatitisüberträgern in Blutspenderkollektiven die Bestimmung der ICDH-Aktivität evtl. in Verbindung mit der jetzt bereits routinemäßig ausgeführten Bestimmung der GPT herangezogen werden. Die Bestimmung

dieser beiden Enzyme nebeneinander würde eine wesentliche Sicherung der Untersuchungserbegnisse bedeuten wegen der guten Korrelation r = 0,85.

Interessante Einblicke in das Enzymgeschehen erhielten wir anhand eines schweren Vergiftungsfalles: Das Enzymmuster des Vergiftungsfalles entspricht dem des Lebergewebes, während das "Lebermuster" bei Hepatitis verzerrt erscheint, was von dem verschieden schnellen Abbau der einzelnen Enzyme herrührt 19) 20).

Zusammenfassung

Es wurden die Enzymaktivitäten der LDH, GOT, GPT und CPK bei einigen Krankheitsbildern mit der ICDH- und α-HBDH-Aktivität in Beziehung gebracht. Für die α-HBDH-Bestimmung konnte die Boehringer Methode modifiziert werden. Für LDH-, α-HBDH- und ICDH-Enzymaktivität wurden Normalwerte aufgestellt. Die α-HBDH-Bestimmung bringt bei Herzinfarkt, Hepatitiden und "Leukosen" eine Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten, da sie die Aussagemöglichkeiten der LDH-Bestimmung ergänzt.

Beim Vergleich von ICDH mit GPT bzw. LDH ergibt sich eine gute Korrelation zur GPT bei Hepatitiden. Hinsichtlich der klinischen Wertigkeit sahen wir in der ICDH-Bestimmung keine so wesentliche diagnostische Verbesserung, daß sie den übrigen Enzymbestimmungen vorzuziehen wäre.

Die elektrophoretische Auftrennung des LDH-Enzymmusters in Verbindung mit der spektrophotometrischen Bestimmung der LDH-Aktivität im gleichen Serum ermöglicht eine Früherkennung der akuten Hepatitis. Ferner läßt sich akuter und ausheilender Herzinfarkt gut verfolgen. Aus Serum von Normalpersonen wurden Normalwerte aufgestellt.

Über die zeitliche Verfolgung der Enzymaktivitäten bei einem Vergiftungsfall mit Essigsäure wird berichtet.

Literatur

1. Hess, B.: Enzyme im Blutplasma, Thieme-Verlag, Stuttgart 1962

2. Wroblewski, F., La Due, J.S.: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 91, 569 (1956)

3. Amelung, D.: Fermentdiagnostik interner Erkrankungen, Thieme-Verlag, Stuttgart 1964

4. Schoen, R. und Südhof, H.: Biochemische Befunde in der Differentialdiagnose innerer Krankheiten, Thieme-Verlag, Stuttgart 1965

5. Vesell, E.S., Bearn, A.G.: Isozymes of lactic dehydrogenase in human tissues, J. clin. Invest. 40 (1961)

6. Rosalki, S.B., Wilkinson, J.H.: Nature 188, 1110 (1960)

7. Elliot, B.A., Wilkinson, J.H.: Lancet I, 698 (1961)

8. Elliot, B.A., Wilkinson, J.H.: Lancet II, 71 (1962)

9. Wolfson, S.K., Williams-Ashman, H.G.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 96, 231 (1957)

10. Elliot, B.A., Wilkinson, J.H.: Clin. Sc. 24, 343 (1963)

11. Hansson, A., Johansson, B., Sievers, J.: Lancet I, 167 (1962)

12. Konttinen, A.: Cardiologia 43, 56 (1963)

13. Rosalki, S.B.: Brit. Heart J. 25, 795 (1963)

14. Schneider, K.W., Heise, E.R., Lehmann, F.G.: Enzymol. biol. clin. 4, 1 (1964)

15. Kubowitz, F., Ott, P.: Biochem. Z. 314, 94 (1943)

16. West, M., Heller, P., Zimmermann, H.J.: Amer. J. med. Sc. 235, 689 (1958)

17. Laborjournal Dr. med. Ch. Fröhlich: Med. Klinik der Universität Tübingen

18. Biochem. Z. 332, 1-60

19. Schulze, G.: Z. ges. exp. Med. 133, 194 (1960)

20. Fleisher, G.A., Wakim, K.G.: Proc. Mayo Clin. 31, 640 (1956)

21. Wroblewski, F.: Ann. N.Y. Acad. Sc. 75, 322 (1958)

22. Wroblewski, F.: Ann. intern. Med. 50, 62 (1959)

23. Schapira, G., Dreyfus, J.: Muscular Dystrophy in Man and Animals, Karger Verlag, Basel - New York 1963

24. Schmidt, E., Schmidt, F.W.: Klin. Wschr. 40, 962 (1962)

25. Karmen, A. et al.: J. clin. Invest. 34, 126 (1955)

26. Tanzer, M.L., Gilvarg, C.: J. biol. Chem. 234, 3201 (1959)

27. Schmidt, E. in Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, Weinheim 752 (1962)

28. Nagel, W., Willig, F., Schmidt, F.H.: Klin. Wschr. 42, 447 (1964)

29. Bruns, F.H., Puls, W.: Klin. Wschr. 32, 656 (1954)

30. Dreyfus, J.C., Schapira, G., Resnais, J., Scébat, L.: Rev. franc. Etud. clin. biol. 5, 386 (1960)

31. Kaffarnik, H., Klaus, D.: Ärztl. Forsch. 16, 361 (1962)

32. Colombo, J.P., Richterich, R., Rossi, E.: Klin. Wschr. 40, 37 (1962)

33. Horn, H.D., Amelung, D.: Dtsch. med. Wschr. 82, 619 (1957)

34. Markert, C.L., Ursprung, H.: Developmental Biology 5, 363 (1962)

35. Schneider, K.W., Lehmann, F.G., Hornung, G.: Med. Klinik 60, 6-11 (1965)

36. Documenta Geigy: Wissenschaftliche Tabellen. 6. Aufl.

37. Schmidt, E., Schmidt, F.W.: Enzym Fibel, Mannheim 1966

38. De Ritis, F., Coltori, M., Giusti, G.: Minerva med. 46, 1207 (1955)

39. Bergmeyer, H.V.: Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße 32 (1962)

40. Cooper, J., Srere, P.A., Tabachnick, M., Racker, E.: Arch. Biochem. Biophysics 74, 306 (1958)

Lebenslauf

Am 28. Juni 1935 wurde ich, Wilfried Grau, als zweiter Sohn des Apothekers Ludwig Grau und seiner Ehefrau Klara, geb. Beer, in Augsburg geboren. Nach dem Abitur am Realgymnasium in Augsburg trat ich 1954 in die Hl. Kreuz Apotheke in Augsburg als Apothekerpraktikant ein. Nach zweijähriger Lehrzeit immatrikulierte ich mich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo ich das Pharmaziestudium 1959 mit dem Staatsexamen abschloß. Nach praktischer Tätigkeit in der elterlichen Apotheke bis zur Erteilung der Approbation immatrikulierte ich mich im Sommersemester 1960 an der Universität Tübingen mit dem Fach Botanik. Unter Leitung von Herrn Professor Dr. L. Bauer arbeitete ich an dem Thema "Stoffwechselvergleich zwischen Gametophyt und Sporophyt eines Laubmooses" und wurde im Herbst 1963 zum Doktor der Naturwissenschaften promoviert. Durch ministerielle Genehmigung war es mir möglich, schon 1961 mit dem Studium der Medizin zu beginnen. Im Februar 1968 legte ich in Tübingen das medizinische Staatsexamen ab. Unter Leitung von Herrn Oberarzt Professor Dr. M. Eggstein befaßte ich mich mit der vorliegenden Arbeit.